



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.**

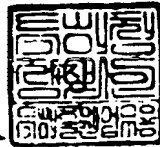
출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0055119 호  
Application Number 10-2003-0055119

출 원 년 월 일 : 2003년 08월 08일  
Date of Application AUG 08, 2003

출 원 인 : (주)아비코아생명공학연구소 외 1명  
Applicant(s) AVICORE BIO TECHNOLOGY INSTITUTE INC., et al

2004 년 9 월 13 일

특 허 청  
COMMISSIONER



Best Available Copy

【서지사항】	
著者명	덕허출원서
著者구분	덕허
著者직	덕허청장
著者인자	2003.08.08
著者의 명칭	조규 정원준기세포의 배양방법 및 이에 의해 수득한 조 규 정원준기세포
著者의 영문명칭	Method for Culturing Avian Spermatogonial Stem Cells and Avian Spermatogonial Stem Cells Prepared thereby
출원인	
【명칭】	( 주)아비코아생명공학연구소
【출원인코드】	1-2001-034930-9
출원인	
【명칭】	재단법인서울대학교산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
대리인	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순,김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정변리사】	최홍순 ,김경철,양부원
【포관위임등록번호】	2001-056972-5
발명자	
【성명의 국문표기】	한재용
【성명의 영문표기】	HAN,Jae Yong
【주민등록번호】	610409-1405718
【우편번호】	135-280
【주소】	서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 17동 308호
【국적】	KR
발명자	
【성명의 국문표기】	홍영호
【성명의 영문표기】	HONG,Yeong Ho
【주민등록번호】	660816-1479032
【우편번호】	442-757

【주소】	경기도 수원시 판단구 원천동 35 원천주공아파트 105동 910호
【국적】	KR
▶【명자】	
【성명의 국문표기】	임정택
【성명의 영문표기】	LIM,Jeong Mook
【주민등록번호】	630405-1052411
【우편번호】	137-769
【주소】	서울특별시 서초구 반포4동 미도아파트 308동 404호
【국적】	KR
▶【명자】	
【성명의 국문표기】	이영목
【성명의 영문표기】	LEE,Young Mok
【주민등록번호】	770909-1120017
【우편번호】	441-440
【주소】	경기도 수원시 권선구 탑동 33단록 9돏트 오성맨션 101호
【국적】	KR
▶【명자】	
【성명의 국문표기】	이막순
【성명의 영문표기】	LEE,Mak Soon
【주민등록번호】	720202-2918425
【우편번호】	440-290
【주소】	경기도 수원시 장안구 파장동 206-8번지
【국적】	KR
▶【명자】	
【성명의 국문표기】	정진경
【성명의 영문표기】	JUNG,Jin Gyoung
【주민등록번호】	771014-2011619
【우편번호】	138-222
【주소】	서울특별시 송파구 잠실2동 주공2단지 254-405
【국적】	KR
▶【사칭구】	청구

미생원기탁]			
【기탁기관명】	한국세포주 연구재단		
【수탁번호】	KCLRF-BP-00080		
【수탁일자】	2003.06.14		
비지]	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규 정에 의한 출원심사 등 청구합니다. 대리인 특허법인 세신(대표변리사 최흥순,김경찬) (인)		
수수료]			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	32	면	32,000 원
【우선권주정료】	0	건	0 원
【심사청구료】	19	항	717,000 원
【합계】	778,000 원		
【감면사유】	전담조직		
【감면후 수수료】	389,000 원		
첨부서류]	1. 요약서·명세서(도면)_1용 2.미생원기탁증명서_1용 3. 위임장_1용 4.전담조직임을 증명하는 서류_1용		

【요약서】

【약】

본 발명은 (a) 조류의 정소란 수득하는 단계; (b) 상기 정소로부터 정소 세포  
클러스터 (population)를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 정소 세포 파클레이션에 포  
된 정원줄기세포란 기저세포 상에서 세포성장인자가 포함된 배지에서 배양하는 단  
단 포함하는 조류 정원줄기세포의 장기 배양방법, 조류 정원줄기세포의 파클레이션  
population) 및 형질전환 조류의 생산방법에 관한 것이다.

【표도】  
도 11

【인어】

정원줄기세포, 조류, 닭, 배양, 장기배양, 기저세포, 성장인자, 정원세포

【명세서】

발명의 명칭]

조류 정원줄기세포의 배양방법 및 이에 의해 수득한 조류 정원줄기세포(Method  
Culturing Avian Spermatogonial Stem Cells and Avian Spermatogonial Stem Cells  
pared thereby]

2면의 간단한 설명]

도 1은 닭 정소조직의 분해 방법 조건에 따른 세포 생존율을 나타내는 그래프이  
. 처리 1: 2단계 효소 처리 방법, 처리 2: van Pelt (1996) 방법, 처리 3: 혼라게  
아제-트립신 처리 방법.

도 2는 기저세포에 따른 닭 정원줄기세포의 배양 양상을 나타내는 그래프이다.  
3 배양한 정원줄기세포를 각각의 기저세포와 함께 공배양한 후 8일째 정원줄기세포  
수를 관찰하여 비교하였다.

도 3은 배양액 조성에 따른 닭 정원줄기세포의 클로니 수를 비교한 그래프이다.

도 4는 배양액 조성에 따른 닭 정원줄기세포의 배양 형태를 보여주는 사진이다.  
b는 DMEM-B 배지, c-d는 DMEM-C 배지에서의 정원줄기세포에 해당된다 (a,c: 100X,  
d: 200X).

도 5는 개별의 성장인자에 따른 닭 정원줄기세포의 클로니 형성 수를 비교한 그  
프이다 (\*: P<0.05).

도 6은 성장인자들의 조합에 의한 닭 정원세줄기세포수의 변화값 보여주는 그래프다 (\*:  $P<0.001$ ).

도 7은 배양온도에 따른 닭 정원줄기세포수의 변화값 보여주는 그래프이다.

도 8은 체외 배양 시 닭 정원줄기세포의 성장곡선에 해당하는 그래프이다.

도 9는 닭 정원줄기세포의 배양 양상을 보여주는 사진이다 (200 X). (a) 초기 배양 3일째, (b) 초기 배양 7일째, (c) 2차 배양 (패시지 1) 5일째, (d) 약 3개월 양한 정원줄기세포 (패시지 6 후 20일째 배양)

도 10은 체외 배양한 닭 정원줄기세포의 PAS (Periodic Acid Schiff's) 염색 양을 보여주는 사진이다 (200 X). (a): 4 주령 닭의 정원줄기세포 (P2), (b): 9 주령 닭의 정원줄기세포 (P2).

도 11은 체외 배양한 닭 정원줄기세포의 FITC-STA 염색 양상을 보여주는 사진이다 (400 X). 3 주령 닭의 정원줄기세포 (패시지 2)를 이용하여 FITC-STA 반응 결과 세포 표면에 강하게 STA가 반응하여 형광을 발하고 있다. (a): 형광 사진, (b): 상차 현미경 사진.

도 12는 체외 배양한 닭 정원줄기세포의  $\alpha 6$ -인테그린 항체에 대한 반응 양상을 보여주는 사진이다 (200 X). 3 주령 닭의 정원줄기세포 (P1).

도 13는 체외 배양한 닭 정원줄기세포의  $\beta 1$ -인테그린 항체에 대한 반응 양상을 보여주는 사진이다 (200 X). 3 주령 닭의 정원줄기세포 (P1).

•

발명의 상세한 설명]

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 조류 정원줄기세포의 장기 배양방법, 조류 정원줄기세포의 파충레이 (population) 및 형질전환 조류의 생산방법에 관한 것이다.

정자형성 과정은 수컷 정소의 정원세포가 분열과 분화 그리고 세포사멸화 (poptosis) 과정을 거치면서 정자를 형성하는 과정이다. 따라서, 정자형성 과정은 매우 복잡하면서 조직화되고 효율적인 생산체계를 갖는다. 닭의 정자형성 과정은 유등들과 매우 유사하며, 포유동물처럼 세정관 (seminiferous tubule)과 간질세포 (nterstitial cell), 이 두 기관이 복잡한 방식으로 상호작용하면서 이루어진다.

조류의 정원세포는 원시생식세포 (Primordial Germ Cells, PGCs)로부터 유래하 . 외배엽 (epiblast)에서 발생하고 원시선 (primitive streak)의 형성초기 단계 동안에 하부층에서 점차적으로 이동하기 시작하여, 내배엽 (hypoblast)을 경유하여 배 외부인 생식선반원 부위 (germinal crescent)에 모이게 된다. 그 후 혈관계가 발달하면서 원시생식세포 (PGC)는 혈관을 따라 순환하여 생식선으로 이동하며, 정소에서 정원세포 (spermatogonia)로 발달한다.

한편, 정원줄기세포는 자기 재생 (self-renewal)과 정자를 생산 할 수 있는 능력을 갖는다 (Morrison 등, 1997). 쥐의 경우 하나의 정원줄기세포가 정모세포 (permatocyte)로 되는데 약 10번의 분열을 한다. 즉, 1개의 줄기세포 (stem cell)



1024개의 정모세포 (spermatocytes)가 되고 일련의 감수분열을 거치면 4096개의 정자 (spermatozoa)가 형성되는 것이다. 물론 이중 75-90%는 세포사멸화 (apoptosis) 과정을 통해 사라진다 (Russell 등, 1990).

정소 내에 존재하는 정원줄기세포는 아주 적은 수가 존재하는데, 생쥐의 경우 소 내에 약  $10^6$  개의 세포가 있는데, 이 중 대략  $2 \times 10^4$  개가 줄기세포 (stem cell)일 것으로 추론된다 (Meistrich & Beek, 1993; Tegelenbosch & de Rooij, 1993). 정원세포 중에 관심의 대상이 되는 세포는 자기 재생능력 (self-renewing)과 체의 전 기간에 걸쳐 정자형성능력을 갖는 정원줄기세포 (spermatogonial stem cell)이다.

분리한 생식세포를 이용하여 체외에서 정자형성과정을 재현하려는 많은 시도들이 있었으나 성공하지 못하였으며, 생쥐의 미성숙 생식세포들 세르톨리 세포 (Sertoli cell)와 공배양하여 반수체의 정자세포 (spermatid)로 분화시키는 데 성공하였으나 (Assouline 등, 1993), 아직도 체외에서의 정자형성은 기술적인 한계를 갖고 있다. 현재까지 체외 배양 (*in vitro* culture) 시스템은 수 주 이상을 넘기기 어려운 것으로 보고 되고 있으며 (Ogawa, 2001; Dirmei 등, 1999; Nagano 등, 1998), 생쥐 경우 약 4개월 동안 유지시켜 수용체에 이식하여 정상적인 정자형성과정이 일어날 보고하였다 (Nagano 등, 1998). 따라서, 정원세포 분리는 제한적이고, 배양 시 많은 정원세포가 죽기 때문에 정원세포의 배양이 어려우며, 특히 정원줄기세포와 분화된 정원세포간의 구별이 가능한 형태학적, 생화학적인 마커가 없다는 것이 가장 큰 어려움이다 (Nagano 등, 1998; van Pelt 등, 2002).

한편, Shinohara 등 (1989)은 생쥐 정원준기세포에  $\alpha 6$ -인테그린 및  $\beta 1$ -인테그린 항체가 다른 조직과 구별되게 반응하여 표지 마커로 이용 가능함을 보고하였으며,에서는 렉틴유인 DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin)가 정소의 생식세포 (spermatogonium)와 정원세포에 생후 30 주령까지 특이적인 반응을 보여 특이 마커로 사용될 수 있음을 입증하였다 (Ertl과 Wrobel, 1992).

생쥐를 비롯한 포유동물의 배양을 통한 정원세포주에 대한 보고는 없으나, ERT (mouse telomerase catalytic component) (Feng 등, 2002), SV40 large T 항원 (van Pelt 등, 2002) 등을 이용한 생쥐 및 쥐의 정원세포주 확립이 보고되고 있다.

소, 돼지 및 말 같은 가축의 정소세포 (testicular cell)를 배양하여 생쥐 정소 세포와 유사하게 (Dobrinski 등, 2000), 소의 type A 정원세포주 장기간 (약 150일) 배양하면서 정원세포의 분열 및 분화양상을 보고한 예가 있으며 (Izadyar 등, 2003), 사의 경우에는 정원세포에 대한 배양은 주로 무정자증과 같은 질환 치료의 목적으로 시도되고 있으나, 정자세포 (spermatid)까지 분화시킨 후 수정시켰을 때, 상심배 (blastocyst)까지 발달하지 못하며 성염색체 이상과 같은 문제를 갖고 있다 (Sousa 등, 2002).

그러나, 닭을 비롯한 조류의 정원세포 배양 및 이용에 대한 연구는 포유동물에 비해 거의 전무한 상태이며, 최근에 형질전환 조류생산을 위한 도구로서 관심이 집중되고 있다. 이러한 정원세포주는 정자형성과정의 분자기작을 밝힐 수 있는 중요한 도구이며, 유전자 조작 및 변형을 통하여 형질전환 개체 생산 및 생식세포의 유전자 치환에도 활용될 수 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명자들은 상술한 당업계의 오랜 요구를 해결하고자 예의 연구 노력한 결과, 조류 정원준기세포의 배양방법을 구축하고, 이를 통하여 수득한 조류 정원준기세포의 특성을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 조류 정원준기세포의 장기 배양방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 정원준기세포의 특성을 나타내는 조류 세포를 포함하는 조류 정원준기세포의 파블레이션 (population)을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 정원준기세포를 이용하여 형질전환 조류의 생산방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면의 해 보다 명확하게 된다.

【발명의 구성】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 조류의 정소를 수득하는 단계; (b) 기 정소로부터 정소 세포 파블레이션 (population)을 분리하는 단계; 및 (c) 상기

소 세포 파클레이션에 포함된 정원줄기세포단 기저세포 상에서 세포성장인자가 포함된 배지에서 배양하는 단계에 포함하는 조류 정원줄기세포의 장기 배양방법을 제공한다.

본 발명은 조류에 있어서, 정원줄기세포의 배양조건 확립 및 특성 규명을 최초로 성공한 발명이다.

본 발명의 방법을 각각의 단계에 따라 상세하게 설명하면 다음과 같다:

단계 1: 조류의 정소단 수득하는 단계

본 발명이 닭에 적용되는 경우, 정원줄기세포 배양을 위한 닭은 발생 -70주령, 바람직하게는 발생 후 -20주령, 보다 바람직하게는 2-10 주령의 수컷을 이한다. 닭의 정소는 경수관을 분리한 후 절개하여 얻을 수 있다.

단계 2: 정소로부터 정소 세포 파클레이션을 분리하는 단계

상기 과정에 의해 분리한 정소 주위의 결체조직 및 막 등을 제거하고 정소조직 둘러싸고 있는 백막을 제거한다. 이어, 정소를 해부용 칼을 이용하여 잘게 절단한 다음, 여러 가지 분해방법을 통하여 분해한 다음, 정소 세포를 분리한다.

본 명세서에서, 용어 "정소 세포 (testicular cell)"은 정원줄기세포, 정원줄기세포에서 유래된 모든 생식세포를 포함한 정원 세포, 세르톨리 세포 (Sertoli cell), 질세포 (Leydig cell) 그리고 기타 결체조직에 관련된 근육세포 등을 포함하는 정 조직 내의 세포군을 의미하며, 용어 "정소 세포 파클레이션"과 혼용된다.

경소 조직의 분해는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있으며, 바람직하게는, 경소로부터 경소 세포단 분리하는 단계는 콜라게나아제, 트립신 또는의 혼합물을 상기 수득한 경소의 조직에 처리하여 실시된다. 보다 바람직하게는, 기의 2단계 효소 처리 방법, van Pelt (1996) 방법 또는 콜라게나아제-트립신 처리법에 따라 실시되며, 가장 바람직하게는 하기의 콜라게나아제-트립신 처리방법에라 실시된다.

① 2단계 효소 처리 방법  
이 방법은 Ogawa 등 (1997)의 방법 및 그의 변형된 방법에 따라 실시된다. 콜라게나아제 타입 I이 용해된 HBSS (Hank's Balanced Salt's solution)에 상기 준비된 경소 조직을 첨가하고, 일정시간 동안 반응시킨 다음 트립신으로 처리한다.

② van Pelt (1996) 방법  
콜라게나아제 타입 I, 트립신, 하이드로코르티손 및 DNase I이 용해된 HBSS 배지에 상기 준비된 경소 조직을 분해한다.

③ 콜라게나아제-트립신 처리방법  
콜라게나아제 타입 I 및 트립신이 용해된 HBSS에서 경소 조직을 분해하고, 피펫으로 경소 조직의 분해단 더 촉진시킨다.

이렇게 분해된 경소 조직 분해물을 적합한 세포 여과기 (등공 지름 약 70  $\mu$ m)로 여과하여 경소 세포단 회수한다.

단계 3: 정소 세포의 파클레이션에 포함된 조류 정원줄기세포를 배양하는 단계

상기 과정에 의해 수득한 정소 세포를 기저세포 상에서 세포성장인자가 포함된 지에서 배양하며, 정소 세포의 파클레이션에 포함되어 있는 조류 정원줄기세포를 양한다.

정원줄기세포의 배양에서는 기저세포가 필수적으로 이용되며, 정원줄기세포는 저세포층에 부착되어 증식하여 콜로니를 형성한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 기저세포는 섬유아세포, 생식기기질세포, 정소기질세포 또는 마우스

0 세포주 (SIM mouse embryo-derived, Thioguanine- and Quabain-resistant fibroblast cell line)이며, 보다 바람직하게는 생식기기질세포 또는 정소기질세포이며, 가장 바람직하게는 생식기기질세포이다. 만일, 본 발명의 방법이 닭에 적용되는 경우에는, 상기 섬유아세포, 생식기기질세포 및 정소기질세포는 닭으로부터 유래된 것을 이용하는 것이 바람직하다.

상기의 기저세포는 배지가 함유된 디쉬 또는 플레이트의 저부에 위치하며, 배지 옮겨진 정원줄기세포는 기저세포층에 부착되어 증식한다.

한편, 정원줄기세포의 배양에 이용되는 배지는 필수성분으로서 세포성장인자를 포함하며, 바람직하게는 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor) (예: 열기 섬유아세포 성장인자), 인슐린-유사 성장인자-1 (insulin-like growth factor-1), 기세포인자 (stem cell factor), 신경교 유래 신경영양성 인자 (glial derived urotrophic factor) 또는 이의 조합을 포함하며, 보다 바람직하게 섬유아세포 성장

자, 인슐린-유사 성장인자-1, 증기세포인자 또는 이의 조합을 포함하며, 가장 바람직하게는 섬유아세포 성장인자 및 인슐린-유사 성장인자-1의 혼합물을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 배지는 분화억제인자를 추가적으로 포함하며, 가장 바람직하게는 류케미아 억제인자 (leukemia inhibitory factor)를 포함한다. 따라서, 본 발명의 배지에 함유되는 가장 바람직한 성장인자 및 분화억제인자는 섬유아세포 성장인자, 인슐린-유사 성장인자-1 및 류케미아 억제인자의 혼합물이다.

또한, 본 발명의 배양에 이용되는 배지는 조류 현청 (예: 닭 현청), 포유류 현청 (예: 우태아 현청) 또는 그의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다. 이외에도, 산화제 (예:  $\beta$ -머캅토포탄올), 항생제-항마이코박테리아제 (antibiotics-timycotics), 비편수 아미노산 (예: 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐, 글라이신, 프롤린 및 세린), 완충제 (예: Heps 완충액) 또는 그의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 배양 단계에서, 배양 온도는 약 37℃가 가장 바람직하다. 조류 체온도가 41℃인 것을 고려하면, 상기 최적의 배양 온도는 특이하다할 것이다.

한편, 상술한 배양 단계에 앞서, 정원줄기세포의 초기 배양 (primary culture) 추가적으로 실시할 수 있다.

단계 4: 조류 정원줄기세포의 동결 단계

상기 과정에 의해 배양된 조류 정원준기세포가 진정한 것인지 여부를 확인하기  
하여, 동정 단계를 실시한다.

상기 동정은 (i) PAS (Periodic Acid Shiff's) 염색, (ii) STA (*Staphylococcus agglutinin*) 염색, (iii) α6-인테그린 항체 염색, (iv) β1-인테그린 항체  
염색, 또는 (v) 상기 염색방법의 조합을 통하여 실시할 수 있다. 바람직하게는,  
정의 신뢰성을 높이기 위하여 하기의 염색방법의 조합을 실시한다.

① PAS 염색

배양한 정원준기세포를 고정액 (예: 인산염 완충액, 글루타르알데히드, 포름알  
데히드 및  $MgCl_2$  포함)에 고정시킨 후, 과요도드산 용액에 반응시키고, 이어 쉬프 시  
프와 반응시켜 염색한다. 세포질이 짙은 자주색으로 염색이 된 경우, 즉 양성 반응  
 나타나는 경우, 조류 정원준기세포로 판정을 내릴 수 있다.

② STA 염색

정원준기세포에 고정액을 처리하여 고정한 후 렉틴류의 하나인 STA에 형광물질  
(예: FITC (fluorescein isothiocyanate))이 결합된 FITC-STA와 반응을 시킨다. 이  
는, 형광현미경으로 관찰한다. 세포 표면에 형광이 관찰되는 경우, 즉 양성 반응이  
 나타나는 경우, 조류 정원준기세포로 판정을 내릴 수 있다.

③ α6-인테그린 항체 염색



정원준기세포에 일차항체인 α 6-인테그린 항체를 처리하고, 이어 표지물질, 예컨대, 형광물질 (예: TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate))가 결합되어 있  
이차항체 (항체의 Fc 도메인에 결합하는 항체로서, 예컨대, 염소 항-마우스 IgG)  
반응시킨 다음, 형광현미경으로 관찰한다. 세포 표면에 형광이 관찰되는 경우, 즉  
성 반응이 나타나는 경우, 조류 정원준기세포로 판정을 내릴 수 있다.

④ β 1-인테그린 항체 염색

상기 α 6-인테그린 항체 방법과 동일하게 실시하되, 일차항체로서 β 1-인테그  
항체를 사용한다.

본 발명의 방법은 다양한 조류, 바람직하게는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거  
, 꿩 또는 비둘기, 가장 바람직하게는 닭에 적용될 수 있다.

본 발명의 방법에 따르면, 조류 정원준기세포를 적어도 2개월, 바람직하게는 적  
도 3개월, 보다 바람직하게는 적어도 4개월, 가장 바람직하게는 적어도 5개월까지  
양할 수 있다.

본 발명의 배양방법에 따르는 경우에는, 신뢰성 있게 조류 정원준기세포를 얻을  
있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 정원준기세포의 특성을  
타내는 조류 세포를 포함하는 조류 정원준기세포의 파플레이션 (population)을 제  
한다.

본 명세서에서, 용어, "조류 정원증기세포의 파클레이션"은 조류 정원증기세포 필수적으로 구성된 세포의 파클레이션을 의미한다. 즉, 본 발명의 조류 정원증기세포의 파클레이션은 완전하게 조류 정원증기세포로만 구성된 세포 파클레이션뿐만 아니라, 다른 세포, 예컨대, 정원세포 등이 미량 함유되어 있는 세포 파클레이션도 포함한다.

상기한 정원증기세포의 특성은 (i) PAS (Periodic Acid Schiff's) 염색, (ii) A (*Sojaum tuberosum* agglutinin) 염색, (iii) α6-인테그린 항체 염색, (iv) β1-테그린 항체 염색, 또는 (v) 상기 염색방법의 조합에서 양성반응을 나타내는 것을 미한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 본 발명의 조류 정원증기세포의 파클레이션에 외래 유전자단 전이시키는 단계; (b) 상기 조류 정원증기세포 파클레이션을 수용체의 정소에 이식하는 단계; 및 (c) 상기 수용체의 자손을 얻어 3질전환 조류를 생산하는 단계를 포함하는 형질전환 조류의 생산방법을 제공한다.

본 발명의 방법에 있어서, 조류 정원증기세포에 외래 유전자단 전이시키는 것은 업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 기동공법 (electroporation), 리포솜-매개 전이방법 (Wong, 등, 1980) 및 레트로바이러스-매개 전이방법 (Chen 등, 1990; Kopchick 등, 1991; Lee & Shuman, 1990)이다. 상기한 전기동공법은 본 발명자들이 개발한 방법에 따라 실시하는 것이 가장 바람직하다 (참조: 특허 제 305715 호).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 외래 유전자는 선택 마커로서 항생 내성 유전자군 포함하고, 상기 (a) 단계 이후에 항생제 내성을 나타내는 정원준기 포단 선택하는 단계가 추가적으로 포함되며, 상기 (b) 단계는 항생제 내성을 나타는 정원준기세포로 실시된다. 본 발명에서 이용될 수 있는 선택 마커는, 진핵세포에 항생제를 부여하는 어떠한 유전자도 가능하며, 예컨대, 네오마이신, 푸로마이신 및 제오마이신 내성 유전자군 포함한다.

조류 정원준기세포단 수용체의 경소에 이식하는 단계는 경소세관에 정원준기세포를 미세주입하는 것이 바람직하다.

이어, 수용체를 다른 개체와 교배시켜 자손을 얻게 되며, 외래 유전자군 함유한 자손이 형질전환 조류가 된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예에 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

원재료 및 방법

1) 공여 닭 및 경소분리

정원준기세포 배양을 위한 닭은 (주)아비코아생명공학연구소에서 사육된 화이트 그혼종 (White Leghorn) 수컷을 이용하였다. 닭의 정소는 공여 닭의 경수관을 분리 후 절개하여 얻었으며, 닭의 주령 변 체중 및 정소 무게를 측정하였다.

2) 정소조직의 분해 방법 비교

분리한 정소는 정소 주위의 결체조직 및 막 등을 제거하고 미세 핀셋을 이용하여 정소조직을 둘러싸고 있는 백막 (tunica albuginea)을 제거하였다. 정소는 해부 칼을 이용하여 실제 현미경하에서 잘게 절단 후, 여러 가지 분해방법을 이용하여 교 분석하였다.

① 2단계 효소 처리 방법 (Two- step enzymatic digestion)에 의한 분리방법

이 방법은 Ogawa 등 (1997)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 즉 위와 같이 비한 정소조직을 HBSS (Hank's Balanced Salt's solution, Invitrogen)에 클라게나제 타입 I (1 mg/mL, Sigma)을 용해한 다음, 37℃ 흔탕배양기 (shaking incubator)서 15분간 처리하였다. HBSS로 세척 후 0.25% 트립신-1 mM EDTA (Invitrogen)로 분간 처리하였다. 분해한 정소 세포는 70 μm 세포여과기 (cell strainer, Falcon 50)로 거른 후 트립판 간두간 이용하여 생존율 및 세포수를 측정하였다.

② van Pelt (1996) 방법에 의한 분리

DMEM (Invitrogen) 배지에 클라게나아제 타입 I (1 mg/mL, Sigma), 트립신 (1 /mL, Sigma), 하이아우로니다아제 II (1 mg/mL, Sigma) 및 DNase I (5 μg/mL, BMS)

용해한 다음, 상기 배지에서 미세하게 잘린 정소조직을 15분 동안 150 사이클/분으로 분해하였다. 이어, DMEM 배지로 3회 세척한 다음, 2번째 분해한 콘라게나아제 타입 I (1 mg/ml), 하이아무로니다아제 II (1 mg/ml, Sigma) 및 DNase I (5 μg/ml, Sigma)이 용해된 DMEM 배지에서 약 30분 동안 실시하여, 정소조직을 완전히 분해하였다. 그런 다음, 70 μm 세포여과기로 거른 후 생존율 및 세포 수를 측정하였다.

### ⑤ 콘라게나아제-트립신 처리방법

HBSS (Invitrogen)에 콘라게나아제 타입 I (1 mg/ml, Sigma)와 0.25% 트립신 (Sigma)을 녹인 조직 분해 배지에서 다음과 같은 방법으로 세포를 분리하였다. 7℃ 흔탕 배양기 (shaking incubator)에서 30분간 150 rpm으로 조직을 분해하면서 5초 간격으로 피펫팅하여 정소조직을 분해하였다. 효소의 활성을 정지하기 위하여, PBS (fetal calf serum) 10%를 첨가한 후 세포 여과기 (cell strainer, 70 μm, Corning 2350)를 이용하여 분해한 세포를 회수하였다. 300 × g로 5분간 원심 분리한 정소세포 (testicular cell)를 확보한 후 트립핀 함유된 배지 이용하여 생존율 및 세포 수를 측정하였다.

### 3) 정소조직 내 정원줄기세포의 분포

닭의 주령변 정소조직의 형태 및 정원준기세포의 분포양상을 관찰하기 위하여, 직분석을 실시하여 정소조직의 특성을 분석하였으며, STA (*Solanum tuberosum* agglutinin)를 이용하여 정원준기세포의 수를 측정하였다.

닭을 비롯한 조류의 정소 조직 내 정원준기세포 수는 아직 보고 되지 않았다. 원준기세포 수를 측정하기 위하여, 약 3주령의 화이트레그혼 (White Leghorn) 종의 정소조직을 콜라게나아제-트립신으로 분해한 후, 0.5% 파라포름알데히드를 이용하여 정세포를 약 5분간 고정하였다. 정원준기세포에 특이적인 렉틴류의 하나인 FITC-결합 STA (*Solanum tuberosum* agglutinin, Sigma)를 이용하여 정소세포에 반응시켰다. 1시간 동안 반응시킨 후 STA와 반응하여 형광을 발하는 세포를 측정하여 전체 정소세

중 차지하는 정원준기세포의 분포를 계산하였다.

4) 기저세포 비교

초기 배양한 정소세포는 약 7-10일 배양 후 적당한 기저세포 (feeder layer)에 옮겨 키워야 하기 때문에, 닭의 정원세포 배양을 위한 최적의 기저세포 비교시험을 행하였다. 우선, 정소세포의 초기 배양을 위하여, 2-4 주령의 수컷 병아리에서 정소조직을 분리한 후 상기에의 콜라게나아제-트립신 처리방법에 의하여 정소조직을 배양하였다. 분해 한 정소조직은 세포 수 및 생존율을 측정한 후 배양 디쉬 (Φ100) 당 2 x10<sup>6</sup> 의 정소세포를 접종하여 8-10일간 배양하였다. 이 때, 배지의 조성은 기저세포가 포함되어 있지 않다는 것만 제외하고, 하기의 정원준기세포의 배지 중 가장 바람직한 것과 동일하다.

6-웰 플레이트 (TPP, EU)에 기저세포로 시험할 닭 섬유아세포 (CEF, chicken bryonic fibroblast), 닭 생식기기질세포 (GSC, gonadal stroma cell) 또는 닭 정기질세포 (TSC, testicular stroma cell)를 배양 (6-8 x 10<sup>4</sup>/well) 하였다. 마우스 STO 세포주 (ATCC CRL-1503)는 마이토마이신-C (10 µg/ml)를 처리하여 세포분열을 억제시킨 후 사용하였다. 상기 과정에 의해 초기 배양된 정원줄기세포는 웰 당 1 x 10<sup>5</sup>의 세포를 준비한 기저세포 위에서 8-10일 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃로 배양하였다. 세포 수를 측정하여 통계를 처리하였다.

5) 배양액 조성에 따른 배양 조건 확립

닭 정원줄기세포의 배양액 조성에 따른 배양조건 확립을 위하여, 다음과 같은 배양액 조성에서 정원줄기세포의 배양양상을 비교하였다.

① DMEM-B (기본배양액)

기본 배양액 조성을 위하여 DMEM (Invitrogen) 배지에 10% (v/v) ES 세포용 우유 혈청 (FBS, Hyclone, Logan UT) 그리고 1x 항생제-항마이코박테리아제 (Invitrogen)을 첨가하여 배지를 조성하였다.

② DMEM-C (첨가제)

위의 기본 배양액 DMEM-B 배지에 2% 닭 혈청 (Invitrogen), 10 mM 비필수 아미노산 (Invitrogen), 10 mM HEPES 완충액 (Invitrogen) 및 0.55 mM β-머캅토에탄올 (Invitrogen)을 첨가하여 배양액을 조성하였다.

⑤ 정원준기세포는 24-웰 플레이트에 패시지 1의 세포단 (1x10<sup>4</sup>/well) GSC 기저포 (8x10<sup>3</sup>/well)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 9일간 37℃로 5반복하여 공 배양한 다음, 콘로니 수를 측정하였다.

#### 6) 첨가물에 대한 최적 배양 조건 확립

각각의 성장인자에 대한 닭 정원준기세포의 배양양상을 비교함으로써 정원준기포 최적 배양조건을 확립하기 위하여, 첨가제가 포함된 배양액을 대조구로 하여 각 성장인자에 대한 배양 패턴을 비교하였다.

① DMEM-C (대조구) 배양액은 위에서 사용한 같은 배양액 조성이며, 여기에 각의 성장인자, 즉 10 ng/ml 인간 류케미아 억제 인자 (Sigma), 10 ng/ml 인간 염기섬유아세포 성장 인자 (Sigma), 100 ng/ml 인간 인슐린- 유사 성장 인자-I (Sigma), 20 ng/ml 인간 준기 세포 인자 (Sigma) 및 100 ng/ml 인간 신경교 유래 신경양성 인자 (R&D system, USA)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃로 배양하였다.

② 정원준기세포는 24-웰 플레이트에 패시지 1의 세포단 이용하였으며 (1x10<sup>4</sup> cell), GSC 기저세포 (8x10<sup>3</sup>/well)를 사용하여 9일간 3반복하여 배양한 다음, 콘로니 수를 측정하였다.

#### 7) 정원준기세포 배양에 대한 배양온도의 효과

닭 정원준기세포 배양을 위한 최적의 배양온도 조건 확립을 위하여, 조류의 체온도인 41℃와 일반적인 배양온도인 37℃에서 온도 효과들을 비교하였다. 배양 배



는 SSC 배지, 즉 DMEM-C (대조구) 배양액에 각각의 성장인자, 즉 2 ng/ml 인간 뉴-미아 억제 인자 (Sigma), 5 ng/ml 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자 (Sigma) 및 ng/ml 인간 인슐린- 유사 성장 인자-1 (Sigma)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양였다. 3주령의 화이트레그혼 경소 세포단 초기 배양하여 10일간 배양한 후 정원기세포단 회수하여 세포 수를 측정하였다.

8) 닭 정원줄기세포의 성장곡선

닭 정원줄기세포의 체외 배양을 위하여 확립된 배양온도, 배양액 그리고 기저세포 이용하여 초기 정소분해 후부터 배양하면서 배양 일수에 따른 정원줄기세포의 변화를 측정하였다. 즉, 초기 분해 후 약 2.0x10<sup>6</sup>/dish (Φ100 mm)의 정소줄기세포를 정원세포배양액과 GSC 기저세포에서 배양하면서 약 10일 간격으로 계대ubculture)하여 정원줄기세포의 수를 측정하였다.

9) 면역세포화학적 방법을 이용한 정원줄기세포 특성 규명

정소 조직으로부터 배양한 닭 정원줄기세포의 특성을 규명하기 위하여, PAS (Periodic Acid Schiff's) 염색 키트 (Sigma), STA (Sigma), 닭 항-인테그린 β1 항 (Sigma) 및 닭 항-인테그린 α6 항체 (Chemicon International, Inc, USA)를 이용하여 배양한 정원줄기세포에서의 양상을 관찰하였다.

① PAS (Periodic Acid Schiff's) 염색

배양한 정원준기세포를 고정액 (50mM 인산염 완충액, 2% 글루타르알데히드, 2% 글루탈데히드 및 2 mM MgCl<sub>2</sub>)에 10분 정도 고정시킨 후, PBS로 3번 세척하였다. 과도산화 용액에 5분간 반응시킨 후, PBS로 다시 3번 세척하였다. 쉬프 시약 (Sigma)을 10분에서 15분 정도 넣어두고, PBS로 씻어낸 후 현미경으로 관찰하였다.

② STA (*Sojanum tuberosum* agglutinin) 염색

정원준기세포에 고정액을 처리하여 고정한 후 렉틴류의 하나인 FITC-STA (Sigma)을 10<sup>-2</sup>으로 희석하여 50 μg/ml로 한 후 1시간 정도 상온에서 반응시켰다. 이후, PBS로 3회 세척하고, 형광현미경 (Nikon TE2000-U, Japan)으로 관찰하였다.

③ α6-인테그린 및 β1-인테그린 염색

정원준기세포에 고정액을 처리한 후 PBS로 세척하고, 2% 노르말 염소 현청으로 고정하기 위해 상온에서 1시간 정도 배양하였다. 일차항체인 α6-인테그린 (hemicon Int.) 및 β1-인테그린의 항체 (Sigma) 모두 20 μg/ml의 농도로 희석하였으며, 실온에서 1시간씩 반응시켰다. 이차항체로는 TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate)가 포함되어 있는 염소 항-마우스 IgG (Jackson Lab)을 사용하였으며 실온에서 1시간 배양 후에 형광 현미경으로 관찰하였다.

원 결과

1) 정소세포 분리방법 비교

닭의 정소조직 분해를 위한 효소처리 방법은 골라게나아제와 트립신을 주성분으로 하여 분해하였는데, 2단계 효소 처리 방법 (Ogawa 등, 1997)과 van Pelt (1996) 방

그리고 클라게나아제와 트립신을 혼합한 방법 등 3가지 방법을 이용하여 분리하였  
 . 분리한 정소세포는 생식세포 (germ cell) 및 기타 체세포들로 구성되어  
 으며, 트립판 갈투란 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다 (참조: 표 1 및 도 1).  
 지 정소세포 분리 방법의 비교 결과, 처리 3방법, 즉 클라게나아제 (1 mg/ml) 및  
 립신 (0.25%)을 이용한 분리방법이 가장 높은 세포 생존율을 나타내었으며, 2단계  
 소 처리 방법이나 van Pelt 방법에 비해 간단하고 시간도 많이 소요되지 않아 처리  
 4 방법이 닭의 정소조직 분해를 위한 가장 효율적인 방법임을 알 수 있었다.

표 1]

정소조직의 분해 방법에 따른 정소세포 생존율 및 세포 수			
횟수	생존율 (%)		
	처리 1	처리 2	처리 3
1	91.4	89.9	94.1
2	88.5	91.1	95.8
3	90.7	91.0	94.5
4	95.5	89.8	95.5
평균 ±SD	91.5±2.92	90.5±0.70	95.0±0.81

## 2) 정소조직 내 정원줄기세포의 분포

아직까지 닭을 비롯한 조류의 정소 내 정원줄기세포 수에 대한보고는 없으며,  
 주 적은 수가 존재하는 것으로 알려져 있다. 생쥐의 경우 정소 내에 약 10<sup>8</sup> 개의  
 포가 있는데, 이 중 대략 2 ×10<sup>4</sup> 개가 줄기세포 (stem cell)임 것으로 추론된다  
 eistrich & Beek, 1993; Tegelenbosch & de Rooij, 1993). 닭의 정소 조직 내  
 원줄기세포의 수를 측정하기 위하여, 약 3주령의 화이트레그혼 종의 정소를 분해한  
 , 핵탄류의 하나인 STA-FITC 접합체를 이용하여 형광을 발하는 세포를 측정하여 전  
 정소세포 중 차지하는 정원줄기세포의 분포를 계산하였다 (참조: 표 2).

포유동물처럼 닭과 같은 조류 역시 정원줄기세포를 구분 할 수 있는 확실한 형질적, 분자화학적 마커가 없기 때문에, 다양한 종류 (STA, WGA, DBA, ConA) 의 렉틴 이용하여 실험한 결과 FITC-STA (*Sojaum tuberosum agglutinin*)가 정원줄기세포 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다. 따라서 STA를 이용하여 측정한 결과 닭 경우 약 0.8%가 정원줄기세포일 것으로 추론된다. 품종 및 주령마다 차이가 있을 수 있지만 2-3주령 화이트레그혼 종의 경우, 경소 내 총 세포수가 약 10<sup>7</sup> 세포가는데 이중 대략 8 x10<sup>4</sup> 개가 줄기세포 (stem cell)일 것으로 판단된다. 이는 생의 0.02% 보다는 약 40배 정도 많은 것으로써, 이와 같은 많은 수의 정원줄기세포 닭의 정원줄기세포의 체외 배양, 세포주 확립 그리고 유전자 조작 등에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

표 2]

수세포 내 FITC-STA와 특이적으로 반응하는 정원줄기 세포 수

FITC-STA 염색 세포 수	총 세포 수	백분율 (%)
8	918	0.88
6	823	0.73
5	637	0.78
-	평균 ±SD	0.80 ± 0.076

3) 정원세포 배양을 위한 최적의 기저세포 확립

닭을 비롯한 조류의 정원줄기세포 배양에 관한 연구는 보고 된 바가 없으며, 배 조건 역시 마우스 등의 정원세포배양과 다른 방법을 시도하였다. 기본적으로 정 줄기세포는 PGC로부터 유래된 세포이기 때문에 EG 배양액을 일부 변경하여 배양액로 사용하였으며 (Park 등, 2000), PGC, 배아생식세포 (Embryonic germ cell) 그리

정원세포 역시 기저세포 의존형 (dependent)이기 때문에 최적의 기저세포를 찾기  
하여, 닭 섬유아세포 (CEF), 닭 생식기기질세포 (GSC), 닭 정소기질세포 (TSC) 및 마  
스 ST0 세포주 등을 이용하여 비교하였다 (참조: 도 2).

초기배양 (primary culture) 후 다시 1차 배양한 정원준기세포를 기저세포와 합  
배양하여 정원준기세포 수를 측정하여 비교하였다. 측정결과 TSC와 용제적인 유  
차는 없었지만, GSC 기저세포와 함께 배양한 정원준기세포의 수가 가장 높게 나타  
으며, CEF와 ST0 세포주의 경우 가장 적은 수치를 나타내었다. 따라서, GSC를 기  
세포로 하여 공 배양하는 것이 정원준기세포의 배양에 가장 적합하다는 결과를 얻  
다. 즉 정소세포의 많은 부분을 차지하는 세르톨리 세포와 같이 배양하는 것이  
원준기세포의 증식 및 발달에 필요한 성장인자를 공급하는 영양세포 (nurse cell)로  
역할을 할 수 있으나 (Souza 등, 2002; van der Wee 등, 2001; Rassoulzadegan  
, 1993), TM4와 SF7과 같이 세르톨리 세포 유래의 세포주와 공 배양 시 세르톨리  
세포의 특수한 기능, 즉 정원준기세포의 분화를 유도하는 역할 때문에 오히려 다른  
세포와 같이 배양하는 것보다 정원준기세포의 생존율을 떨어뜨리는 결과를 초래할  
있다는 것을 알 수 있었다 (Nagano 등, 2003).

TSC의 경우 3주령 이하의 병아리 정소조직에서 분리한 세포가 가장 좋았으며,  
F는 너무 빨리 자라서 말리는 경향이 있고 칸로니를 떼어낼 때 CEF가 같이 떨어져  
단점이 있었다. ST0는 생쥐 및 포유동물 준기세포의 훌륭한 기저세포임에도 관  
하고 마이토마이신-C를 처리하여 배양 시 칸로니 형성이 다른 기저세포에 비해 떨  
지며 세포들이 계속해서 조금씩 떨어지는 현상을 나타내었다.

4) 배양액 조성에 따른 배양 조건 확립

닭 정원줄기세포의 배양액 조성에 따른 배양조건 확립을 위하여, 기본배지 MEM-B) 와 첨가물이 들어간 배지 (DMEM-C)에서 9일간 배양한 후 콜로니 수를 측정하여 비교하였다. 측정 결과 DMEM-C에서 닭 정원줄기세포의 콜로니 형성이 DMEM-B 비하여 약 14배정도 높게 나타났다 (참조: 표 3 및 도 3).

이는 DMEM-C 배양액에 첨가된 첨가물에 의한 결과로 보여 지며, 닭 혈청, 대사련 물질인 비펄수 아미노산, 완충제인 HEPES 완충액 그리고 항산화제인 β-머르캅에탄올 등이 복합적으로 작용한 것으로 판단된다. 한편, Nagano 등 (2003)이 발한 논문에서는 기본배지 그리고 대사기질과 완충제 등이 첨가된 배지에서 마우스 원줄기세포의 배양은 차이가 없는 것으로 보고하고 있으나, 본 발명에서는 두 배지의 효과 차이가 크게 났다.

세포의 상태는 DMEM-B의 경우, 대부분의 세포가 하나의 세포 상태로 머물러 있 세포가 많았으며, 세포크기가 작아지는 패턴을 보였다 (도 4의 a 및 b). 반면, EM-C에서 자란 세포의 경우, 콜로니 형성이 왕성하였으며 세포의 크기나 형태에 있어서 P0에서의 정원줄기세포와 같은 양상을 보였다 (도 4의 c 및 d).

표 3]

배양액 조성에 따른 콜로니 수의 비교		
실험 횟수	DMEM-B	DMEM-C
1	212	2652
2	192	2636
3	172	2816
4	144	1636
5	140	2332
평균 ±SD	172 ± 30.8	2514 ± 411

##### 5) 첨가물에 대한 최적 배양 조건 확립

각각의 성장인자에 대한 닭 정원준기세포의 배양양상을 비교함으로써, 정원세포 최적 배양조건을 확립하기 위하여, 배양 첨가물이 포함된 배양액을 대조구로 하여 성장인자에 대한 배양 양상을 비교하였다. 준기세포 인자 (SCF), 류케미아 억제자 (LIF)와 엽기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)는 이미 PGC의 유지 및 증식을 촉진시키는 것으로 보고 되었으며 (Matsui 등, 1992; Resnick 등, 1992), GDNF도 *in vivo*에서 정원준기세포의 분화를 조절하는 중요한 요소임이 입증되었다 (Meng 등, 2000; Nagano 등, 2003).

각각의 성장인자에 대한 효과를 관찰하기 위하여, 24-웰 플레이트에서 약 9일간 배양 후 클로니 수를 측정하여 비교하였다.

- ① DMEM-C (대조구)
- ② DMEM-C + LIF (10 ng/ml)
- ③ DMEM-C + bFGF (10 ng/ml)
- ④ DMEM-C + SCF (20 ng/ml)
- ⑤ DMEM-C + IGF-1 (100 ng/ml)
- ⑥ DMEM-C + GDNF (100 ng/ml)

각 웰의 정원준기세포 클로니를 측정한 결과, 성장인자가 포함되지 않은 대조구 양액이 오히려 LIF, bFGF, IGF-1 그리고 GDNF를 첨가한 것보다 많은 클로니를 형성하였으며, SCF를 첨가한 것이 가장 많은 클로니를 형성하는 것을 관찰하였다 (참조:

4 및 도 5). 이는 SCF가 정원충기세포의 분열을 자극하였다고보다는 오히려 아무  
 항을 미치지 않았다고 판단 된다 (Ohta 등, 2000). LIF, bFGF 또는 IGF-1의 첨가  
 성장인자들 포함하지 않고 배양한 것과 비교해 볼 때 오히려 정원충기세포의 분열  
 나 성장에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 마우스의 정원  
 기세포에서의 결과와 어느 정도 일치하는 것을 알 수 있다 (Nagano 등, 2003).  
 면에 GDNF는 정원충기세포의 분화군 억제하여 미분화된 정원충기세포의 축적을 일  
 키는 것으로 알려져 있으며 (Meng 등, 2000), 생쥐 정원충기세포에서 다른 성장인  
 에 비해 유의적으로 높게 나타난 반면, 본 실험에서는 오히려 가장 낮은 결과값 보  
 다 (참조: 표 4 및 도 5). 각 성장인자에 대한 배양 양상을 보면 커다란 차이는  
 견한 수 없지만, 대조구의 경우 칸로니 형성 및 수가 양호한 반면에 LIF, IGF-1 그  
 고 GDNF 가 첨가된 정원세포는 칸로니 형성이 감소하며 그 수도 대조구에 비해 떨  
 진다.

표 4]

각인자에 따른 정원충기세포의 칸로니 수 비교

실험 횟수
 

	DMEM-C	LIF	b-FGF	SCF	IGF-1	GDNF
1	1368	892	1096	1392	1148	880
2	1304	976	1212	1492	980	924
3	1440	1008	1252	1392	1188	1000
평균 ±SD	1370 ± 68	956 ± 59	1186 ± 81	1425 ± 57	1105 ± 110	934 ± 60

칸로니 수

각각의 성장인자는 다른 인자와 상호 작용하여 상승효과를 유발하는데, LIF의  
 우 조류 배아충기세포, 원시생식세포 그리고 배아생식세포의 장기간 배양에 꼭 필



한 요소이며, bFGF, SCF 등과 같이 배양 시 높은 효과를 기대할 수 있다 (Pain 등, 96; Park 등, 2000). 본 실험에서 보듯이, 각각의 성장인자에 대한 효과는 SCF군 이외하고는 대조군 (DMEM-C)에 비해 낮았으나 (도 5), LIF, bFGF, IGF-1 그리고 SCF 같이 첨가하여 배양하였을 때, 오히려 대조군보다 고도의 유의적인 증가 경향을 나타내어 (SCF 미첨가: 2.8배, SCF 첨가: 2.2배), 전체적으로 성장인자간의 효과가 정되었으나, 닭 정원줄기세포의 경우 SCF 첨가 시 첨가하지 않은 처리구에 비해 낮 결과를 보여, SCF가 닭 정원줄기세포의 분화 또는 세포사멸화 (apoptosis)를 유도 는 것으로 판단된다 (표5, 도 6).

표 5]

실험 횟수	정원줄기세포수 (x 10 <sup>4</sup> )		
	DMEM-C	LIF+bFGF+IGF-1	LIF+bFGF+IGF-1+SCF
1	5.8	14.9	13.9
2	6.9	15.6	13.0
3	6.1	16	14.2
4	5.7	17.9	13.6
5	5.3	16	11.9
평균 ±SD	5.96 ± 0.535	16.06 ± 0.994	13.32 ± 0.813

6) 정원줄기세포 배양에 대한 배양온도의 효과

닭을 비롯한 조류는 포유류와 달리 체온이 높으며 (약 41℃), 정소가 체내에 존재한다. 따라서 정상적인 세포 배양 온도인 37℃와 닭의 체온인 41℃에서 정소세포 배양하여 정원줄기세포의 수의 변화를 관찰한 결과, 37℃에서 정원줄기세포가 약 2배 더 잘 배양되는 것으로 나타났다 (참조: 표 6, 도 7). 이는 생쥐의

우 37℃와 체외 경소 최적온도인 32℃의 온도 비교에서 유의적인 차이가 없었던 것은 대조적이다 (Nagano 등, 2003).

표 6]

실험 횟수	정원줄기세포수 (x 10 <sup>3</sup> )	
	37℃	41℃
1	73	27
2	98	51
3	78	35
평균 ±SD	83.0 ± 13.2	37.6 ± 12.2

7) 닭 정원줄기세포의 성장곡선

마우스를 비롯한 포유동물의 정원세포는 분리 시 제한된 수의 세포를 분리할 수 없으며, 체외 배양 시 많은 정원세포가 죽기 때문에 정원세포의 배양이 어렵다. 닭을 비롯한 조류의 정원줄기세포 역시 같은 양상을 보이며 다만 마우스보다는 많은 닭의 정원줄기세포를 분리할 수 있다는 장점이 있다. 닭의 정원줄기세포는 기저세포의존형이기 때문에 생식기기질세포 (GSC)와 같이 배양하였으며, 생쥐의 경우보다 상대적으로 많은 수의 정원줄기세포가 존재하여 (약 0.08%), 비특배양 중에 적지 않은 정원줄기세포가 죽지만 세포의 수를 측정할 수 있었다.

약 10일 간격으로 배양하면서 계대한 결과, 3번 계대 후 까지는 세포의 수가 점적으로 증가하였지만, 이후로는 많은 수의 정원줄기세포가 죽는 것을 알 수 있다 (조: 도 8). 실제로 패시지 4 이후로는 많은 수의 정원줄기세포가 세포 사멸화 과정을 거치면서 전체 세포 수는 감소하고 일부 정원줄기세포만이 계속적으로 분열하는 양상을 보였다.

·

### 8) 조류 정원준기세포의 장기배양 조건 확립

닭을 비롯한 조류의 정원준기세포의 배양, 특히 장기배양에 관한 연구는 전무한 데이며, 다만 생쥐 (Nagano, 등, 2001; Kanatsu-Shinozuka 등, 2003) 와 소 (Izadyar, 2003) 등의 정원준기세포간 약 5개월 정도 배양한 보고가 전부이다. 한편, 대부분의 정원준기세포는 배양 초기에 많은 수가 죽기 때문에 배양의 어려움이 있다.

닭의 정원준기세포 배양을 위하여 초기배양 시 전체 정소세포간 배양 접시에 약 0일간 배양한 후 (참조: 도 8의 a 및 b), 콘로니가 형성된 정원준기세포간 떼어낸 기저세포가 준비된 배양접시에 배양하는 방법을 취하였다 (도 8의 c 및 d). 배양초에는 주로 세르플리 세포 등이 먼저 자라기 시작하면서 3-4개의 세포로 구성된 작 콘로니를 형성하였으나 (도 9의 b), 정원준기세포를 회수하여 생식기기저세포 (SC) 와 함께 배양하였을 때, 정원준기세포의 수가 급격히 증가하였다 (도 9의 c). 한 세대 후에도 콘로니간 형성하면서 성장하여, 3개월 이상의 장기간 체외배양이 가능함을 확인하였다 (도 9의 d). 따라서, 기저세포 및 분리하는 닭의 주령에 따라 양기간 또는 정원세포의 상태에 약간의 차이가 있지만, 본 발명에 의해 약 5 개월 장기배양이 가능하게 된다. 즉, 2-4주령의 닭에서 분리한 정원준기세포가 5-8주에서 분리한 정원준기세포보다 세포의 배양 양상이 다르고, 장기배양이 어려운데는 5주령 이후부터 일어나는 타입 B 정원세포로의 분화와 관련이 있는 것으로 판단다.

9) 면역세포화학적 방법을 이용한 정원줄기세포 특성 규명

닭을 비롯한 마우스 및 쥐 그리고 포유동물의 타입 A 정원줄기세포군 구별할 수 있는 확실한 형태학적, 분자화학적 마커가 없기 때문에 다양한 연구들이 시도되고 있다. 마우스에서 생식세포 (gonocyte)와 정원세포 (spermatogonia)에 특이적인 α-인테그린 및 β1-인테그린 표면 마커에 대한 보고가 있었으며 (Shinohara 등, 99). 이를 바탕으로 닭의 α6-인테그린 및 β1-인테그린에 대한 항체와 PAS 염색 그리고 렉틴류인 STA를 이용하여 초기 분리한 정소세포와 배양된 정원줄기세포군 이 하여 반응양상을 관찰하였다.

① PAS 염색

닭의 원시생식세포 (PGC) 및 배아생식세포 (EG cell)의 경우 세포질 내에 존재는 다량의 글리코겐 때문에 검은 자주색으로 염색되어 다른 세포와의 구별이 가능하다 (Meyer, 1964; Park 등, 2000). 특히 배아생식세포의 경우 장기간 배양 후에 PAS에 특이적으로 염색되는 경향이 있다.

비록 같은 발생학적 단계는 아니지만 닭의 정원줄기세포도 원시생식세포 유래의 세포이기 때문에 PAS 키트를 이용하여 염색한 결과, PGC 나 EG cell 같이 검은 자주색으로 염색되었다. 특히 4주령과 9주령의 서로 다른 정소에서 분리하여 배양하고, 대한 후에도 정원줄기세포에 특이적으로 염색되는 양상을 보여 다른 세르톨리 세포 기저세포와의 구별이 가능함을 보여주었다 (참조: 도 10).

② STA-FITC 염색반응

렉틴류에 대한 닭 정원충기세포의 특이적 반응양상을 규명하기 위하여, DBA (*Dioscorea biflora* agglutinin), STA (*Solanum tuberosum* agglutinin), WGA (*Triticum vulgaris* agglutinin), ConA (*Canavalia ensiformis* agglutinin) 등의 렉틴을 이용한 실험 결과, DBA는 핵과 세포막 부위뿐만 아니라, 기저세포에서도 염색이 되었으며, WGA는 정원충기세포와 기저세포 그리고 ConA는 대부분이 기저세포에 반응하였다. 특히 A는 기저세포가 아닌 정원충기세포에 특이적으로 반응하였는데, 장기간 배양 후에 (때시저 8) 동일한 염색양상을 나타내어 정원충기세포의 특이 마커로 사용이 가능 것으로 판단된다 (참조: 도 11). 이와 같은 결과는 STA가 인식하는 (N-아세틸글루코사민)<sub>3</sub>가 닭 정원충기세포에 특이적으로 존재함을 의미한다.

한편, Izadyar 등 (2002)이 같은 렉틴류인 DBA가 비독 닭의 정원세포와 기저세포 모두에 염색이 되었지만, 소의 정원충기세포에 특이적으로 반응하여 정원충기세포의 수분리 및 이종간 이식 후에 종간 구별 마커로 사용할 수 있다는 것을 입증한 것과 이, 본 실험의 결과는 STA 렉틴은 닭의 정원충기세포의 순수분리 및 이종간 이식의 종간 구별 마커로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### ⑤ 닭 정원충기세포의 α 6-인테그린 및 β 1-인테그린 반응

α 6-인테그린 및 β 1-인테그린은 일반세포에서 헤테로다이어머간 이루어 세포내외 신호전달에 중추적인 기능을 담당한다. 특히 α 6-인테그린 및 β 1-인테그린은 우스의 정원충기세포 표면에서 발현하는 특이적인 마커로서의 이용이 가능하다 (hinohara 등, 1999) .

한편, 닭의 α6-인테그린 및 β1-인테그린을 정원줄기세포에 적용한 결과, 닭의 정원줄기세포에서도 특이성을 보여 정원줄기세포의 마커로서의 가능성을 보였다 (참조 도 12 및 13). 특히, α6-인테그린의 경우 β1-인테그린보다는 세포면에 좀 더 많이적으로 염색이 되는 양상을 나타내었다. 정원줄기세포의 세포막무과 단백질인 α6-인테그린 및 β1-인테그린에 의해 기저세포에서 분비되는 성장인자 또는 억제자 영향을 받아 정원줄기세포의 전반적인 신호전달, 즉 분화 또는 세포사멸화의 신호달에 영향을 미치는 것으로 보인다.

상술한 배양 과정 및 동경과정에 의해 닭 정원줄기세포로 규명된 세포를 hSSC라 명명하고, 한국세포주연구재단에 2003년 6월 14일자로 기탁하고, 기탁번호 LRF-BP-00080단 부여받았다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과]

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 조류 정원줄기세포의 장기 배양법, 조류 정원줄기세포의 파플레이션 및 형질전환 조류의 생산방법을 제공한다.

발명의 방법에 따르는 경우에는 신뢰성 있게 조류 정원줄기세포를 얻을 수 있다.  
한, 수득한 조류 정원줄기세포는 정자형성과정의 분자 유전학적 이해 그리고 유전 조작에 의한 형질전환 조류의 생산에 이용될 수 있다.

고 문헌

Chen, H.Y., et al., (1990) Vectors, promoters & expression of genes in chick embryo. J. Reprod. Fert. 41:173-182.

Dirami G., et al., (1999) Effects of stem cell factor and granulocyte crophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod. 61:225-230.

Dobrinski, I. et al., (2000) Germ Cell Transplantation From Large Domestic Animals Into Mouse Testes. Mol. Reprod. Dev. 57:270-279.

Ertl, C. and Wrobel K.H. (1992) Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectinhorseradish peroxidase conjugates Histochemistry 97:161-171.

Feng, L.-X., et al., (2002) Generation and in Vitro Differentiation of a spermatogonial Cell Line. Science 297:392-395.

Izadyar F., et al., (2002) Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction 124:85-94.

Izadyar, F., et al., (2003) Proliferation and Differentiation of Bovine  
pe A Spermatogonia During Long-Term Culture. Biol Reprod 68:272-281.

Kanatsu-Shinohara M., et al., (2003) Long-term proliferation in culture  
d germline transmission of mouse male germline stem cells. Biology of  
production. [Epub ahead of print].

Kopchick, J.J. et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant  
A into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P.  
selltime, pp.275-293, Boston: Butterworth-Heinemann.

Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Transgenic quail produced by retrovirus  
ctor infection transmit and express a foreign gene marker. Proc. 4th World  
ngr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110.

Matsui Y., Zsebo K. and Hogan B.L.M. (1992) Derivation of pluripotent  
bryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell  
:841-847.

Weistrich M.L., van Beek MEAB. (1993) Spermatogonial stem cells. In:  
sjardins C, wing LL (eds.), Cell and Molecular Biology of the Testis. New  
rk: Oxford University Press: 266-295.

Meng X., et al., (2000) Regulation of cell fate decision of  
differentiated spermatogonia by GDNF. Science 287: 1489-1493.



Meyer D.B. (1964) The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Developmental Biology* 10:154-180.

Morrison S.J., et al., (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88:287-298.

Nagano M., et al., (2001) Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13090-13095.

Nagano, M., et al., (1998) Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Science* 281:978-981.

Nagano, M., et al., (2003) Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod.* [Epub ahead of print]

Ogawa T., et al., (1997) Transplantation of testis germinal cells into seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 41:111-122.

Ogawa, T. (2001) Spermatogonial transplantation: the principle and possible application. *J. Mol. Med.* 79:368-374.

Pain B., et al., (1996) Long-term in vitro culture and characterization of human embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.

Park T.S. and Han J.Y. (2000) Derivation and Characterization of  
 unipotent Embryonic Germ Cells in Chicken. Molecular Reproduction and  
 Development 56:475-482.

Rassoulzadegan M., et al.. (1993) Transmeiotic differentiation of male  
 germ cells in culture. Cell 75:997-1006.

Resnick J.L., et al.. (1992) Long-term proliferation of mouse primordial  
 germ cells in culture. Nature 359: 550-551.

Russell L.D., et al.. (1990) Histological and Histopathological Evaluation  
 of the Testis. Clearwater, IL: Cache River Press. pp 158.

Shinohara, T., et al.. (1999) 1- and 6-integrin are surface markers on  
 spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:5504-5509.

Sousa, M., et al.. (2002) Developmental potential of human spermatogonial  
 cells co-cultured with Sertoli cells. Human Reprod. 17(1):161-172.

Tegelenbosch R.A. and de Rooij D.G. (1993) A quantitative study of  
 spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid  
 mouse. Mutation Research 290 193-200.

VAN Pelt A.M., et al.. (2002) Establishment of Cell Lines with Rat  
 Spermatogonial Stem Cell Characteristics. Endocrinology 143:1845-1850.

van der Wee K.S., et al.. (2001) Immunomagnetic isolation and long-term  
 culture of mouse type A spermatogonia. J Androl. 22: 696-704.

van Pelt A.M., et al., (1996). Isolation of the synchronized A  
ermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. Biol Reprod  
(2):439-444.

Wong, T.K. et al., (1980) *Gene*, 10:87.

Yan W., Suominen J. and Toppari J. (2000) Stem cell factor protects germ  
cells from apoptosis in vitro. J. Cell Science 113: 161-168.

특허청구범위]

요구항 1]

다음의 단계들 포함하는 조류 정원준기세포의 장기 배양방법:

- (a) 조류의 정소란 수득하는 단계;
- (b) 상기 정소로부터 정소 세포 파출레이션 (population)을 분리하는 단계; 및
- (c) 상기 정소 세포 파출레이션에 포함된 정원준기세포를 기저세포 상에서 세포 장인자가 포함된 배지에서 배양하는 단계.

요구항 2]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 클라게나아제, 트립신 또는 이의 혼합물을 기 수득한 정소의 조직에 처리하여 실시됨을 특징으로 하는 방법.

요구항 3]

제 2 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 클라게나아제 및 트립신의 혼합물을 상기 특한 정소의 조직에 처리하여 실시됨을 특징으로 하는 방법.

요구항 4]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 기저세포는 섬유아세포, 생식기기질세포, 소기질세포 또는 마우스 STO 세포주인 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 5]

제 4 항에 있어서, 상기 기저세포는 생식기기질세포 또는 경소기질세포인 것을  
정의로 하는 방법.

부구항 6]

제 5 항에 있어서, 상기 기저세포는 생식기기질세포인 것을 특징으로 하는 방법

부구항 7]

제 1 항에 있어서, 상기 세포성장인자는 섬유아세포 성장인자, 인슐린-유사 성  
인자-1, 줄기세포인자, 신경교 유래 신경영양성 인자 및 이의 조합으로 구성된 군  
로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 8]

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 분화억제인자를 추가적으로 포함하는 것을 특징  
로 하는 방법.

•

ꣳ구항 9]

제 8 항에 있어서, 상기 분화억제인자는 류케미아 억제인자인 것을 특징으로 하는 방법.

ꣳ구항 10]

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 섬유아세포 성장인자, 인슐린- 유사 성장인자-1 류케미아 억제인자의 혼합물을 포함하는 보충물을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

ꣳ구항 11]

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 혈청 및 항산화제를 추가적으로 포함하는 것을 정으로 하는 방법.

ꣳ구항 12]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 배양 온도는 약 37℃인 것을 특징으로 하는 방법.

•

부구항 13]

제 1 항에 있어서, 상기 조류는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 또는 비기인 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 14]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c) 이후에 조류의 정원준기세포를 동정하는 단계 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 15]

제 14 항에 있어서, 상기 조류 정원준기세포의 동정은 (i) PAS (Periodic Acid Schiff's) 염색, (ii) STA (*Sojaum tuberosum* agglutinin) 염색, (iii) α6-인테그린체 염색, (iv) β1-인테그린 항체 염색 또는 (v) 상기 염색방법의 조합으로 실시는 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 16]

정원준기세포의 특성을 나타내는 조류 세포를 포함하는 조류 정원준기세포의파레이션 (population).

부구항 17]

제 16 항에 있어서, 상기 정원준기세포의 특성은 (i) PAS (Periodic Acid  
iff's) 염색, (ii) STA (*Sojaum tuberosum* agglutinin) 염색, (iii) α6-인테그린  
체 염색, (iv) β1-인테그린 항체 염색, 또는 (v) 상기 염색방법의 조합의 양성  
응인 것임을 특징으로 하는 조류 정원준기세포의 파클레이션.

부구항 18]

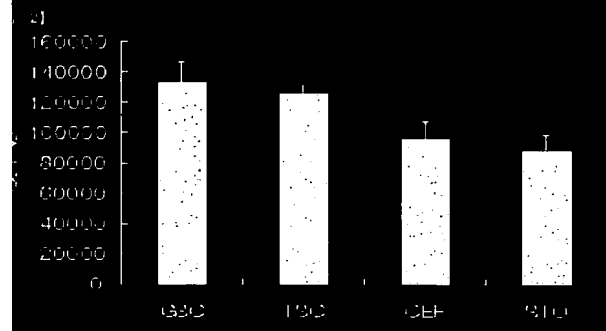
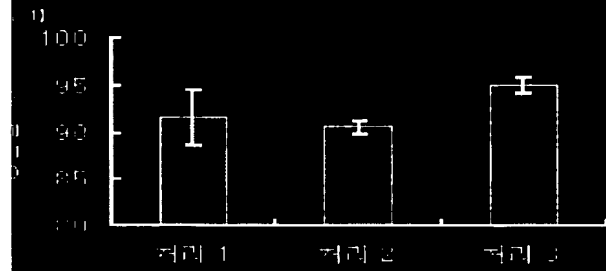
제 16 항에 있어서, 상기 조류 정원준기세포의 파클레이션은 상기 제 1 항 내지  
15 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 조류 정원준기세  
의 파클레이션.

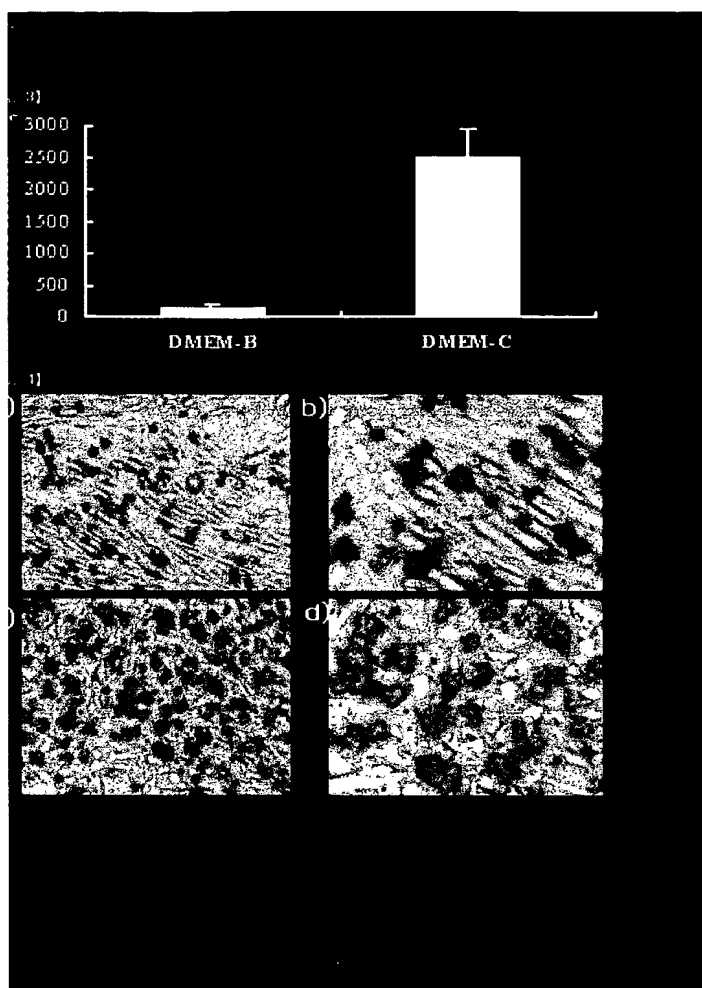
부구항 19]

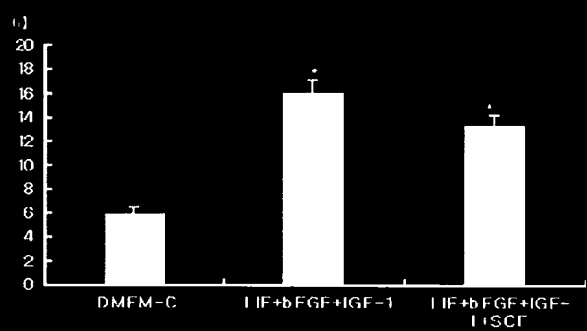
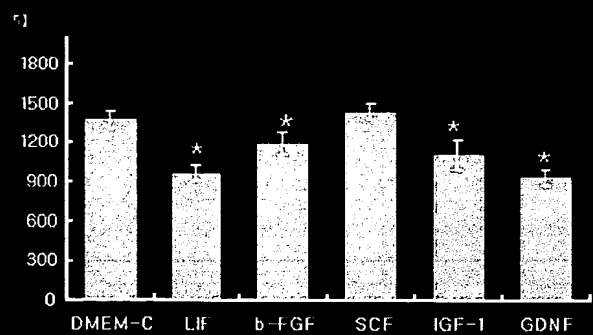
- 다음의 단계들 포함하는 형질전환 조류의 생산방법:
- (a) 상기 제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 조류 정원준기세포의 파클  
이선에 의해 유전자단 전이시키는 단계:
  - (b) 상기 조류 정원준기세포의 파클레이션을 수용체의 정소에 이식하는 단계:
  - (c) 상기 수용체의 자손을 얻어 형질전환 조류를 생산하는 단계.

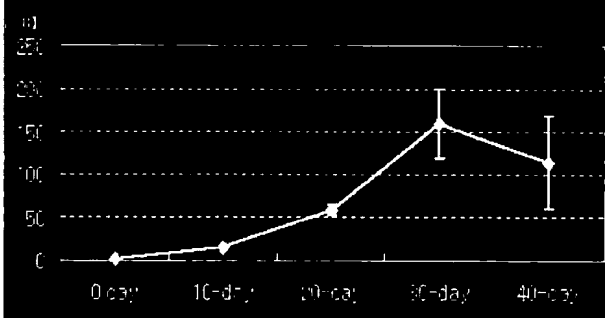
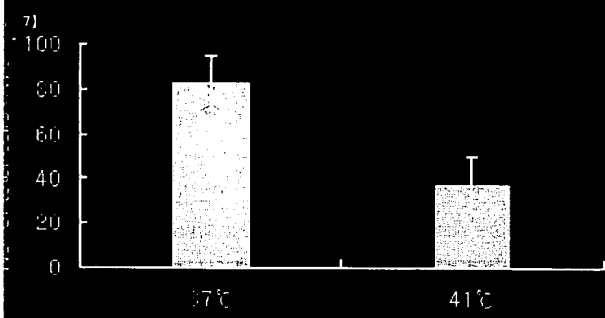


(b) (b)





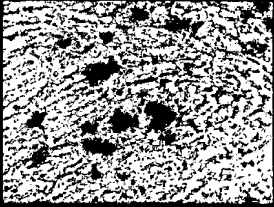




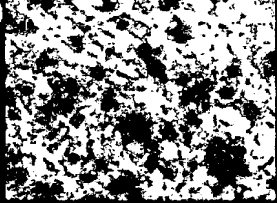
a)



b)



c)



d)



e)



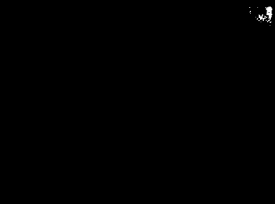
f)



11)



b)



12)



b)



13)



b)



# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/001992

International filing date: 06 August 2004 (06.08.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2003-0055119  
Filing date: 08 August 2003 (08.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 13 September 2004 (13.09.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**